

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Kateřina Kudláčková

VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ 4-AMINOPYRIDINU

Voltammetric determination of
4-aminopyridine

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. Jiří Zima, CSc.

Praha 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 25. srpna 2017

Poděkování

Děkuji prof. RNDr. Jiřímu Zimovi, CSc. za cenné rady a připomínky v průběhu zpracovávání bakalářské práce.

Klíčová slova

4-Aminopyridin

Diferenční pulzní voltametrie

Uhlíkové pasty

Key words

4-Aminopyridine

Differential pulse voltammetry

Carbon paste electrodes

Abstrakt

V této bakalářské práci bylo prozkoumáno voltametrické chování 4-aminopyridinu za pomoci uhlíkové pastové elektrody. Pro studium byla použita diferenční pulzní voltametrie. Měření probíhalo v prostředí Brittonova-Robinsonova pufru o různých hodnotách pH, přičemž za optimální bylo zvoleno pH 9. Byla prokázána pasivace elektrody při měření analytu, doba akumulace neměla vliv na výšku signálu 4-aminopyridinu.

Za optimálních podmínek byla proměřena kalibrační závislost a určena mez detekce $8,76 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ a mez stanovitelnosti $1,85 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ 4-aminopyridinu. Linearita kalibrační přímky byla posouzena pomocí korelačního koeficientu.

Abstract

In this thesis, the voltammetric behavior of 4-aminopyridine was investigated using carbon paste electrode. Differential pulse voltammetry was used for the study. Measurements were carried out in Britton-Robinson buffer medium with different pH values. Optimal pH value found was 9. The electrode passivation during consecutive measurements of 4-aminopyridine without the surface renewal was confirmed, while the accumulation time had no influence on peak heights of 4-aminopyridine.

Limit of detection was $8,76 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ and limit of quantification was $1,85 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ of 4-aminopyridine under optimal conditions. The linearity of the calibration curve was evaluated using the correlation coefficient.

Obsah

1	Teoretická část	8
1.1	Cíl práce	8
1.2	4-Aminopyridin	8
1.3	Diferenční pulzní voltametrie	10
1.4	Uhlíková pastová elektroda	11
2	Experimentální část	12
2.1	Chemikálie	12
2.2	Přístroje	13
2.3	Postup spektrofotometrického měření	13
2.4	Postup měření diferenční pulzní voltametrií	13
2.5	Zpracování výsledků	14
3	Výsledky a diskuse	16
3.1	Spektrofotometrické měření stálosti	16
3.2	Optimalizace metody	18
3.2.1	Vliv pH	18
3.2.2	Pasivace elektrody	20
3.2.3	Vliv doby akumulace	21
3.3	Kalibrační závislost	23
3.4	Kalibrační závislost s použitím modifikované uhlíkové pastové elektrody	26
4	Závěr	27
	Literatura	28

Seznam zkratek

CAS	Chemical Abstracts Service
LD ₅₀	Letální dávka, která je smrtelná pro 50 % testovaných jedinců [mg kg ⁻¹]
OSHA	Agentura pro bezpečnost a ochranu zdraví při práci (Occupational Safety and Health Administration)
UV	Ultrafialové záření (Ultra Violet)
C18	Oktadecylový uhlíkový řetězec
<i>c</i>	Koncentrace [mol dm ⁻³]
<i>E</i>	Potenciál [mV]
<i>E_p</i>	Potenciál píku [mV]
<i>I</i>	Proud [nA]
<i>I_p</i>	Proud píku [nA]
LOD	Mez detekce
LOQ	Mez stanovitelnosti
<i>r</i>	Korelační koeficient
SD	Směrodatná odchylka

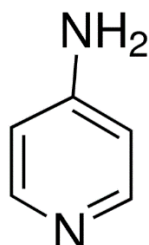
1 Teoretická část

1.1 Cíl práce

Cílem bakalářské práce je studium elektrochemické oxidace 4-aminopyridinu, který se používá pro symptomatickou léčbu roztroušené sklerózy [1], pomocí metody diferenční pulzní voltametrie na uhlíkové pastové elektrodě.

1.2 4-Aminopyridin

Charakteristika. 4-Aminopyridin je organická sloučenina a jeden ze tří izomerů aminopyridinu. Je známý jako fampridin a jeho sumární vzorec je $C_5H_6N_2$, č. dle CAS je 504-24-5 a relativní molekulová hmotnost je 94,12 [2].



Obr. 1.1. Chemická struktura 4-aminopyridinu

4-Aminopyridin zvyšuje uvolňování acetylcholinu z nervových zakončení a obrací účinky neurosvalových blokátorů. Podává se intravenózně a orálně u neurologických poruch jako je Eaton-Lambertův myastenický syndrom (velmi vzácné autoimunitní onemocnění v presynaptické části neurosvalového spojení, kdy protilátky působí presynapticky ke snížení uvolňování acetylcholinu), Guillain-Barré syndrom (vzácné zánětlivé onemocnění postihující periferní nervy vycházející z míchy a řadí se mezi polyneuropatie - akutní idiopatické demyelinizační neuropatie), roztroušená skleróza (chronické zánětlivé a demyelinizační onemocnění postihující centrální nervovou

soustavu, nejčastější neurologické onemocnění diagnostikované u osob ve věku 20 až 40 let a u žen dvakrát více než u mužů), poranění míchy, Alzheimerova choroba demence a u pacientů s botulismem (způsobuje exotoxin z *Clostridium botulinum*) pro zvrát neurosvalových blokády. Orální dávka je 30 až 50 mg denně. Je považován za specifickou protilátku při otravě blokátory vápníkových kanálů. Nežádoucí účinky v klinických studiích jsou nespavost, záchvaty, parestezie, závratě, nevolnost a typickými účinky jsou křeče. U roztroušené sklerózy látka blokuje draselný kanál a dochází ke zlepšení demyelinizovaných vláken. U malého množství pacientů pomohl při zlepšení chůze a obratnosti [3].

Fyzikální a chemické vlastnosti. Jedná se o bezbarvý krystalický prášek [4]. Teplota tání je 155 - 158 °C a teplota varu je 273 °C [5]. Je rozpustný ve vodě (112 g l⁻¹ při 20 °C) [6], ethyletheru, benzenu a ethanolu [7, 8].

Farmakologie. 4-Aminopyridin (Fampyra) se používá ve formě tablet s prodlouženým uvolňováním s obsahem účinné látky 10 mg. Jedná se o blokátor draslíkových kanálů, kdy dojde ke snížení toku iontů a prodloužení repolarizace a zvýšení tvorby akčního potenciálu v demyelinizovaných axonech. 4-Aminopyridin je při perorálním podání rychle a celkově absorbován z gastrointestinálního traktu s nízkým terapeutickým účinkem. Jedná se o léčivo rozpustné v tucích, které snadno prochází hematoencefalitickou bariérou. Neváže se na plazmatické proteiny (frakce vázaná v lidské plazmě 3 - 7 %). Distribuční objem je přibližně 2,6 l kg⁻¹. 4-Aminopyridin metabolizuje oxidací na 3-hydroxy-4-aminopyridin (katalyzováno v jaterních mikrozomech cytochromem P450) a je konjugován na 3-hydroxy-4-aminopyridin-sulfát. Nebyla nalezena *in vitro* aktivita těchto metabolitů vůči draselným kanálům. 4-Aminopyridin je vylučován převážně renální exkrecí. 90 % dávky je vyloučeno v původní lékové formě během 24 hodin. Za pomoci glomerulární filtrace a exkrece prostřednictvím renálního transportéru je clearance 370 ml min⁻¹. Vylučování pomocí stolice je méně než 1 % podané dávky. Farmakokinetika 4-aminopyridinu je lineární s konečným poločasem vylučování asi 6 hodin. Ke kumulaci dochází u pacientů s poruchou funkce ledvin [9]. LD_{50,oral, krysa} = 21 mg kg⁻¹ [5].

Analýza. 4-Aminopyridin byl analyzován pomocí plynové chromatografie s dusíko-fosforovým detektorem: metoda OSHA PV2143, detekční limit 9,7×10⁻⁸ mol dm⁻³ (9,13

ppb) [10]. Tenkovrstvá chromatografie byla využita pro separaci 2-, 3- a 4-substituovaných pyridinů [11]. Vlastnosti excitovaných stavů protonovaných molekul 2-, 3- a 4-aminopyridinu byly zkoumány pomocí UV fotofragmentační spektroskopie [12]. Pro měření 4-aminopyridinu v krevní plazmě morčat byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí při 266 nm. Vzorky byly mikrofiltrovány po přidání vnitřního standardu 3,4-diaminopyridinu a dávkovány do sférické kolony oxidu křemičitého [13]. Test pro kvantitativní odhad 4-aminopyridinu v biologických tekutinách je popsán za použití 2-aminopyridinu jako vnitřního standardu a vysokoúčinné kapalinové chromatografie s reverzní fází (C18) s detekcí při 263 nm [14].

1.3 Diferenční pulzní voltametrie

Voltametrie je analytická elektrochemická metoda, která patří mezi dynamické potenciostatické metody. V elektrochemickém článku probíhá oxidačně-redukční reakce, kdy je studovaná látka stanovována z procházejícího elektrického proudu při potenciálu, který je charakteristický pro daný analyt. Protékající proud je měřen v závislosti na potenciálu, který se s časem mění a je vkládán na pracovní elektrodu. Elektrochemický článek se skládá ze tří elektrod. Toto zapojení je výhodnější než dvoelektrodové, protože potenciál lze přesněji určit - měří se za bezproudého stavu mezi referenční a pracovní elektrodou. Materiálem polarizovatelné pracovní elektrody je rtuť, uhlík nebo platina. Nepolarizovatelné elektrody jsou referenční a pomocná. Jako referenční elektroda se používá elektroda II. druhu a pomocná elektroda je vyrobena z platiny [15, 16].

Pulzní voltametrické techniky jsou s výhodou používány pro své nízké detekční limity [17]. Při diferenční pulzní voltametii se potenciál lineárně mění s časem a k měření protékajícího proudu dochází před vložení pulzu a na jeho konci (po asi 40 ms) [15]. Tento rozdíl je vyneseno proti použitému potenciálu v podobě voltametrické křivky ve tvaru píku. Tím se eliminuje rušivý vliv kapacitního proudu [17].

1.4 Uhlíková pastová elektroda

První publikovaný text o uhlíkové pastové elektrodě byl od R. N. Adamse v roce 1958 [18].

Uhlíková pastová elektroda se skládá ze dvou částí: uhlíkové pasty a specializovaného pouzdra [19]. Uhlíková pasta se připravuje smísením práškového uhlíku s hydrofóbní netěkavou inertní kapalinou, většinou minerálním olejem [17]. Tato směs se dá modifikovat vhodnými látkami pro specializovanou detekci, jako jsou nanomateriály, komplexy kovů, surfaktanty a další látky [20, 21]. Protože jsou uhlíkové pasty velmi měkké, musejí se uchovávat ve specializovaných pouzdrech. Pouzdro je krátká, většinou teflonová trubice naplněná uhlíkovou pastou, která je v kontaktu s vodivým drátkem [22].

Výhody uhlíkové pastové elektrody oproti jiným elektrodám jsou vysoká citlivost, snadná obnovitelnost povrchu elektrody, široké potenciálové okno nebo její snadná modifikace [23]. Potenciálový rozsah je ovlivněn prostředím, ve kterém se měří. V kyselém prostředí je rozsah od $-1,0$ V do $+1,5$ V, v neutrálním prostředí je od $-1,3$ V do $+1,4$ V a v bazickém prostředí je od $-1,2$ V do $+1,2$ V [22]. Nevýhodou uhlíkové pastové elektrody může být její horší reprodukovatelnost přípravy [23].

Popularita uhlíkové pastové elektrody tkví ve snadné dostupnosti a její přípravě o požadovaném složení [22].

2 Experimentální část

2.1 Chemikálie

Studovanou látkou byl 4-aminopyridin 99% čistoty (Sigma-Aldrich, USA). Byl připraven zásobní roztok o koncentraci $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ 4-aminopyridinu v deionizované vodě.

Brittonův-Robinsonův pufr byl připraven ze tří kyselin: 2,744 g kyseliny borité (p.a., Lachema Brno, ČR), 2,7 ml kyseliny trihydrogenfosforečné (85%, p.a., Lach-Ner Neratovice, ČR) a 2,31 ml octové kyseliny (98%, Lach.Ner Neratovice, ČR) bylo rozpuštěno v objemu 1 l deionizované vody. Požadované pH bylo upraveno roztokem 0,2M hydroxidu sodného (p.a., Lach. Ner Neratovice, ČR), který byl připraven rozpuštěním 8,0 g v 1 l deionizované vody.

Uhlíková pasta byla připravena navážením 250 mg mikrokuliček skelného uhlíku (průměr 0,4 – 12 μm , Alpha Aesar, USA), které byly smíchány se 110 μl minerálního oleje (CAS: 8042-47-5, Sigma-Aldrich). Ve třecí misce byla pasta důkladně homogenizována.

Modifikace uhlíkové elektrodové pasty byla provedena podle studie [20]. Byla připravena navážením 335 mg uhlíkového prášku CR-2 (rozpuštěn v diethyletheru) a 37 mg uhlíkových nanotrubiček (multi-walled $\geq 98 \%$, $10 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm} \times 4,5 \text{ nm} \pm 0,5 \text{ nm} \times 3 \sim 6 \mu\text{m}$, Sigma-Aldrich), které byly smíchány se 175 μl minerálního oleje (CAS: 8042-47-5, Sigma-Aldrich) a pasta byla důkladně zhomogenizována ve třecí misce.

2.2 Přístroje

Pro měření pH byl použit pH-metr 3510 (Jenway, UK) s kombinovanou skleněnou elektrodou.

Pro měření spekter byl použit spektrofotometr Agilent 8453 (Agilent Technologies, USA).

Pro voltametrická měření byl použit Eco Tribo Polarograph Praha, software Polar 5.1 (ECO Trend, ČR). Měření bylo provedeno ve tříelektrodovém uspořádání. Jako pracovní elektroda byla použita uhlíková pastová elektroda (CPE, teflonové pouzdro, průměr 2 mm, naplněná uhlíkovou pastou). Jako referentní elektroda byla použita argentchloridová elektroda (3 mol dm^{-3} , ECO Trend, ČR). Jako pomocná elektroda byla použita platinová plíšková elektroda (ECO Trend, ČR).

2.3 Postup spektrofotometrického měření

Spektrofotometrická měření probíhala za laboratorní teploty v rozsahu od 200 do 700 nm v křemenné kyvetě o délce optické dráhy 1 mm. Byla proměřena spektra zásobního roztoku o koncentraci $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ 4-aminopyridinu ihned po přípravě, 1 dni a 14 dnech. Zásobní roztok byl skladován v lednici při teplotě 4 °C. Byly zaznamenány vlnové délky a hodnoty absorbance v absorpčních maximech.

2.4 Postup měření diferenční pulzní voltametrií

Měření vzorku probíhalo vždy pětkrát při laboratorní teplotě. Nastavené parametry byly: rozsah měření od 0 do 1500 mV, rychlost polarizace 20 mV s^{-1} , výška pulzu 50 mV, šířka pulzu 80 ms a klidová doba 5 s. Povrch uhlíkové pastové elektrody byl před každým měřením obnoven otřením filtračním papírem, který byl navlhčen deionizovanou vodou. Z naměřených voltamogramů byly odečteny hodnoty E_p a I_p příslušného píku.

Pro optimalizaci pH byla připravena sada roztoků smícháním 1 ml zásobního roztoku 4-aminopyridinu s 9 ml Brittonova-Robinsonova pufru o hodnotě pH v rozsahu 2 až 12, lišících se vždy o jednotku. Výsledná koncentrace měřeného roztoku 4-aminopyridinu byla $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$.

Při studiu pasivace elektrody byl pipetován 1 ml zásobního roztoku 4-aminopyridinu o koncentraci $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ do odměrné baňky. Objem byl doplněn Brittonovým-Robinsonovým pufrem o pH 9 na celkový objem 10 ml. Výsledná koncentrace roztoku 4-aminopyridinu byla $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. Povrch uhlíkové pastové elektrody nebyl obnovován.

Při sledování vlivu času na akumulaci analytu na elektrodě bylo použito 100 μl zásobního roztoku 4-aminopyridinu o koncentraci $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Roztok byl doplněn Brittonovým-Robinsonovým pufrem o pH 9 na celkový objem 10 ml. Výsledná koncentrace roztoku 4-aminopyridinu byla $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Akumulace probíhala při nulovém potenciálu po dobu 0, 30, 60, 120 a 300 sekund. Roztok byl při akumulaci míchán.

Kalibrační závislost byla proměřena z 10 standardních roztoků v koncentračním rozmezí od 2×10^{-6} do $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. Roztoky byly připraveny smícháním 20, 40, 60, 80, 100, 200, 400, 600, 800 a 1000 μl zásobního roztoku 4-aminopyridinu o koncentraci $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ s Brittonovým-Robinsonovým pufrem o pH 9 za doplnění na objem 10,00 ml. Kalibrační závislost ve stejném koncentračním rozmezí byla proměřena i za použití modifikované uhlíkové pastové elektrody.

2.5 Zpracování výsledků

Naměřené hodnoty byly použity do dalších výpočtů a zobrazení v grafech jako průměry z pěti opakovaných měření. Odečtené hodnoty kalibrační závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese.

Mez detekce byla vypočítána podle vzorce:

$$LOD = \frac{3 \times SD - B}{A}$$

kde LOD je mez detekce (mol dm^{-3}), SD směrodatná odchylka (nA), B je úsek (nA) a A směrnice ($\text{mol}^{-1} \text{dm}^3$).

Mez stanovitelnosti byla vypočítána podle vzorce:

$$LOQ = \frac{10 \times SD - B}{A}$$

kde LOQ je mez stanovitelnosti (mol dm^{-3}), SD směrodatná odchylka (nA), A je úsek (nA) a B směrnice ($\text{mol}^{-1} \text{dm}^3$).

Linearita kalibrační závislosti byla vyhodnocena pomocí Pearsonova korelačního koeficientu, jehož hodnota by měla být v druhé mocnině $r^2 > 0,99$.

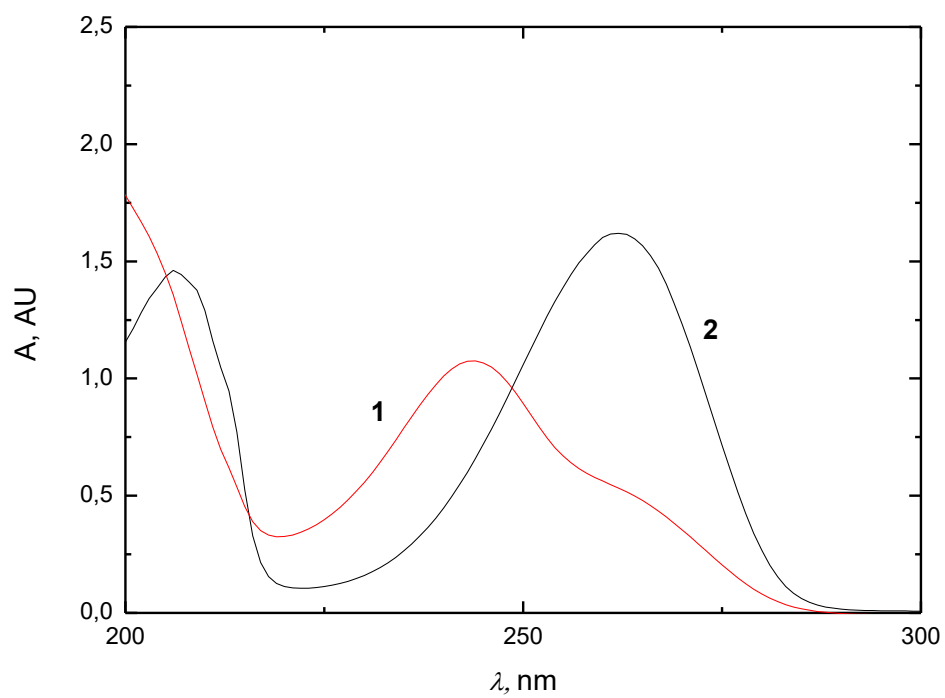
3 Výsledky a diskuse

3.1 Spektrofotometrické měření stálosti

Stálost 4-aminopyridinu na světle byla sledována spektrofotometricky. Čerstvě připravený zásobní roztok 4-aminopyridinu měl absorpční maximum při vlnové délce 244 nm. Zásobní roztok změřený po 1 dni měl absorpční maximum také při 244 nm. Spektrum roztoku měřeného po 14 dnech obsahuje 2 absorpční maxima při vlnových délkách 205 a 262 nm (Obr. 3.1). Došlo pravděpodobně k posunu celého spektra k vyšším vlnovým délkám. Látka také po uplynulé době vykazuje v absorpčním maximu při 262 nm vyšší absorbanci než maximum čerstvého roztoku (244 nm). Vlnové délky a absorbance v maximu jsou uvedeny pro různě dlouhé doby skladování analytu v tabulce 3.1. Z experimentu je zřejmé, že 4-aminopyridin není v čase stálý a z toho důvodu byly před každým měřením vždy připraveny nové zásobní roztoky.

Tab. 3.1 Změna absorpčního maxima $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ zásobního roztoku 4-aminopyridinu v čase

t, dny	$\lambda_{\text{max } 1}, \text{nm}$	A, AU	$\lambda_{\text{max } 2}, \text{nm}$	A, AU
0	244	1,075	-	-
1	244	0,964	-	-
14	205	1,476	262	1,772

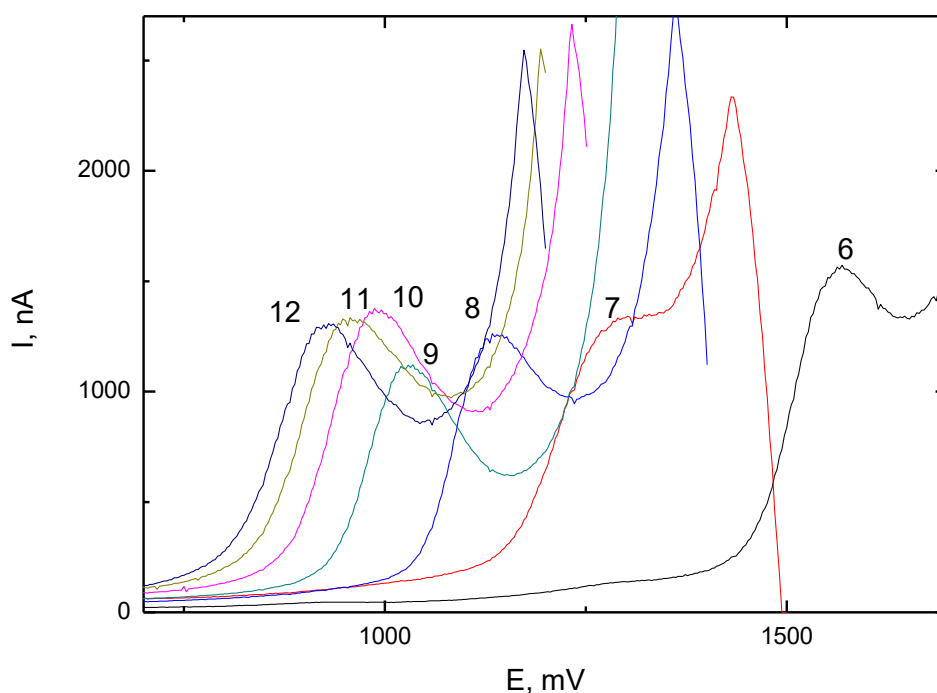


Obr. 3.1 Naměřená spektra $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ 4-aminopyridinu analyzovaného ihned po přípravě (1) a po 14 dnech (2), křemenná kyveta 1 mm, rozsah měření 200 - 700 nm.

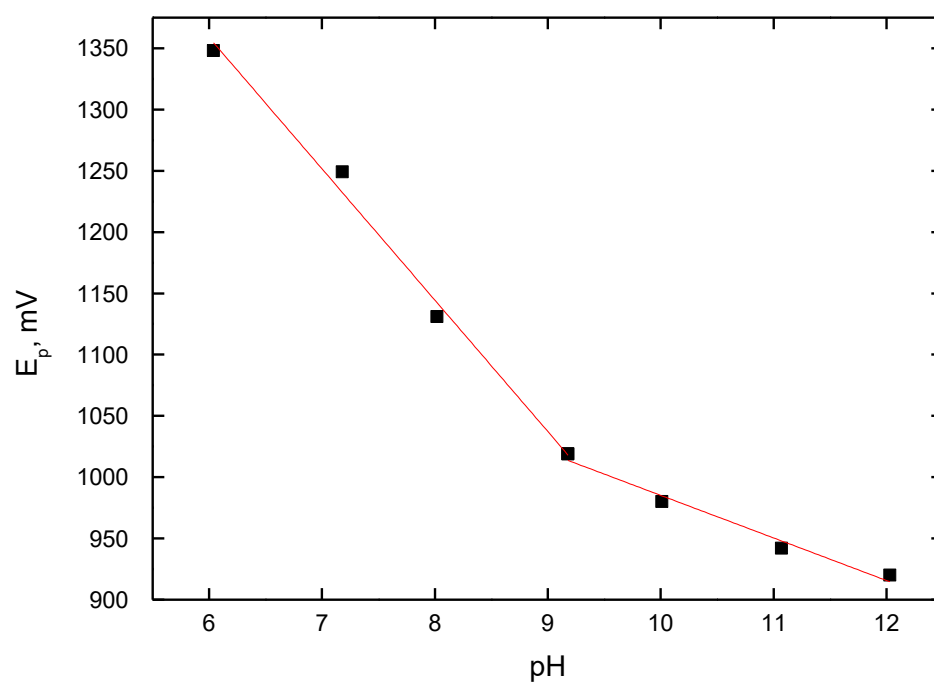
3.2 Optimalizace metody

3.2.1 Vliv pH

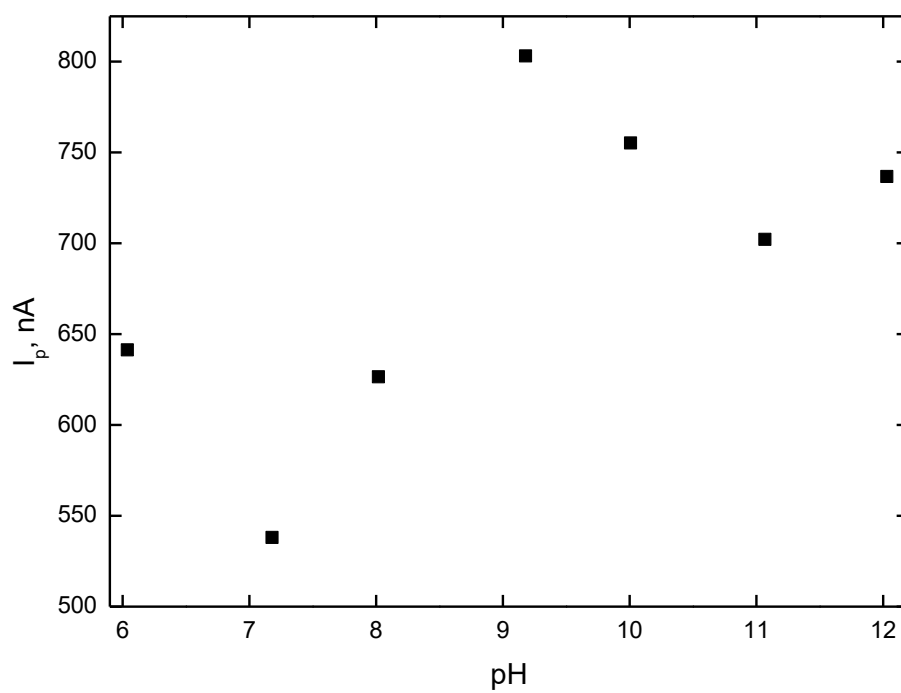
Roztoky v rozmezí pH od 6 do 12 poskytovaly při měření jediný pík, což odpovídá jednomu centru elektrochemické aktivity (obr. 3.2). Při hodnotě pH 5 a nižší nebylo možné odečíst hodnoty potenciálu píku analytu, protože se 4-aminipyridin za daných podmínek neoxidoval. Se zvyšující se hodnotou pH docházelo k poklesu hodnot potenciálu a zkrácení potenciálového okna. Z uvedeného vyplývá, že se 4-aminipyridin snáze oxiduje při vyšších hodnotách pH, přičemž z grafu (obr. 3.3) je zřejmé, že optimální pH odpovídá hodnotám mezi 9 a 12, kdy se hodnota potenciálu zvyšuje minimálně. Vzhledem k největší proudové odezvě (obr. 3.4) bylo jako optimální určeno pH 9.



Obr. 3.2 Naměřené voltamogramy $1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ 4-aminopyridinu na uhlíkové pastové elektrodě v Brittonově-Robinsonově pufru v rozmezí pH od 6 do 12. Číslice odpovídá hodnotě pH. Parametry: rychlost polarizace 20 mV s^{-1} , výška pulzu 50 mV, šířka pulzu 80 ms.



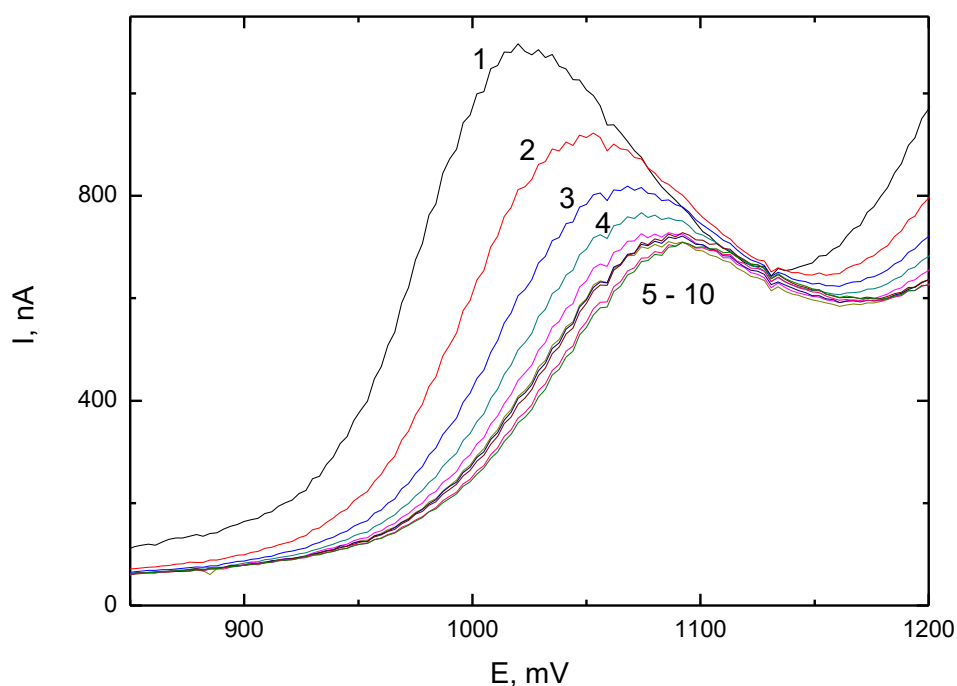
Obr. 3.3 Závislost potenciálu píku 1×10^{-4} mol dm^{-3} 4-aminopyridinu na pH Brittonova-Robinsonova pufru.



Obr. 3.4 Závislost proudu píku 1×10^{-4} mol dm^{-3} 4-aminopyridinu na pH Brittonova-Robinsonova pufru.

3.2.1 Pasivace elektrody

Pro zjištění míry pasivace elektrody byla provedena série měření bez obnovy povrchu elektrody. Podle grafu (Obr. 3.5) docházelo ke znatelnému poklesu proudu a k následné pasivaci elektrody. Pokles proudu byl výrazný již při druhém měření, proto je vhodné elektrodu po každém měření řádně očistit.

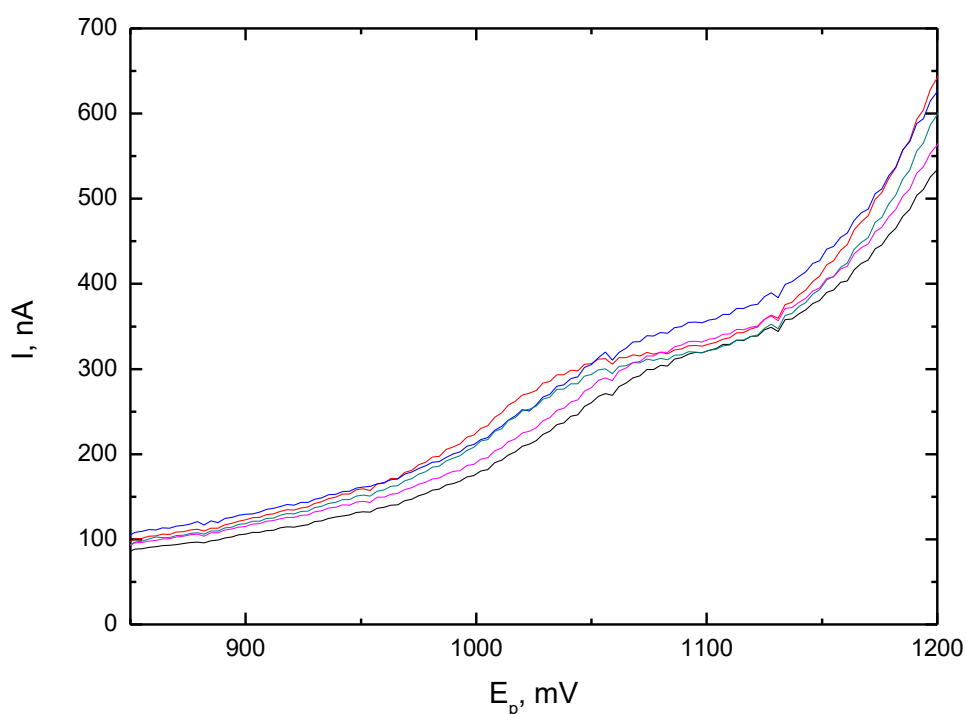


Obr. 3.5 Opakovaná měření 1×10^{-4} mol dm^{-3} 4-aminopyridinu na uhlíkové pastové elektrodě v prostředí Brittonova-Robinsonova pufru bez mechanického očištění elektrody při pH 9. Parametry: rychlost polarizace 20 mV s^{-1} , výška pulzu 50 mV, šířka pulzu 80 ms. Číslice označují pořadí měření.

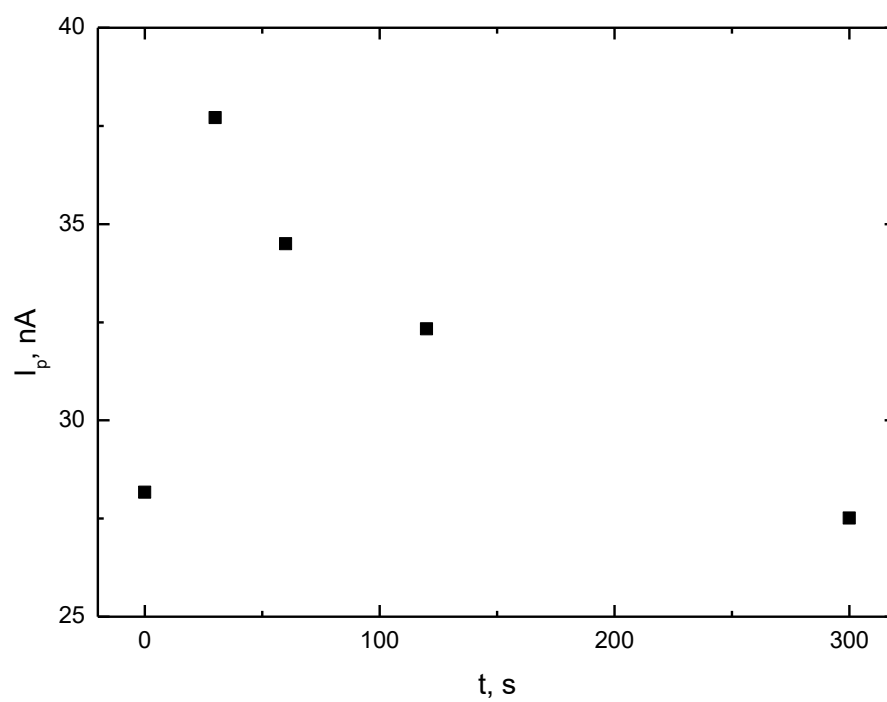
3.2.3 Vliv doby akumulace

Pro zvýšení citlivosti metody byla studována akumulace analyzované látky na povrchu pracovní elektrody. Míra akumulace závisí na čase a velikosti vloženého potenciálu. Při nulovém potenciálu byl studován vliv doby akumulace při 30, 60, 120 a 300 sekundách.

Bylo zjištěno, že doba akumulování nemá pro analyzovanou látku význam, protože nedošlo ke statisticky významnému zvýšení hodnoty proudu analytu.



Obr. 3.6 Opakovaná měření $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ 4-aminopyridinu na uhlíkové pastové elektrodě v prostředí Brittonova-Robinsonova pufru při pH 9 a časové akumulaci. Parametry: rychlost polarizace 20 mV s^{-1} , výška pulzu 50 mV, šířka pulzu 80 ms. (černá) 0, (červená) 30, (modrá) 60, (zelená) 120 a (fialová) 300 s, parametry: rychlost polarizace 20 mV s^{-1} , výška pulzu 50 mV, šířka pulzu 80 ms.



Obr. 3.7 Závislost proudové odezvy na době akumulace $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ 4-aminopyridinu na uhlíkové pastové elektrodě v prostředí Brittonova-Robinsonova při pH 9.

3.3 Kalibrační závislost

Pro ověření linearity odezvy na koncentraci 4-aminopyridinu v Brittonově-Robinsonově pufru o pH 9 (obr. 3.8) byla proměřena kalibrační závislost. Přehled parametrů kalibračních přímk je uveden v tabulce 3.2 se získanými hodnotami mezi detekce a stanovitelnosti. Hodnoty proudů jednotlivých standardů byly vyneseny do grafu v závislosti na jejich koncentraci (obr. 3.9).

Soubor bodů byl proložen metodou lineární regrese, s výslednou rovnicí:

$$I = 9c - 40$$

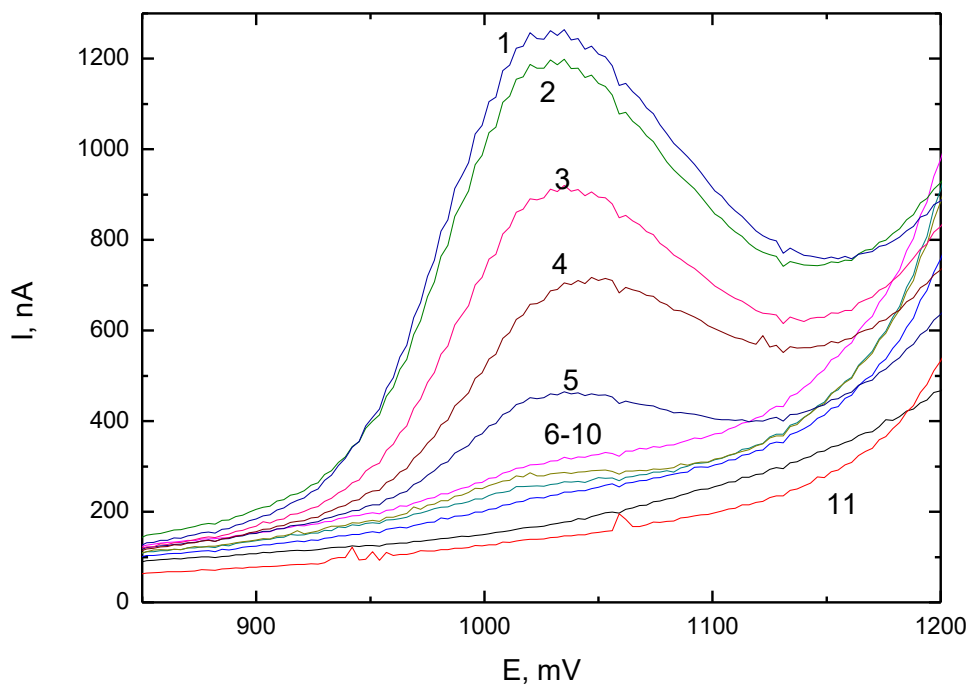
$$r = 0,9990$$

kde I je proudová odezva (nA), c koncentrace ($\times 10^{-6}$ mol dm^{-3}) a r je korelační koeficient.

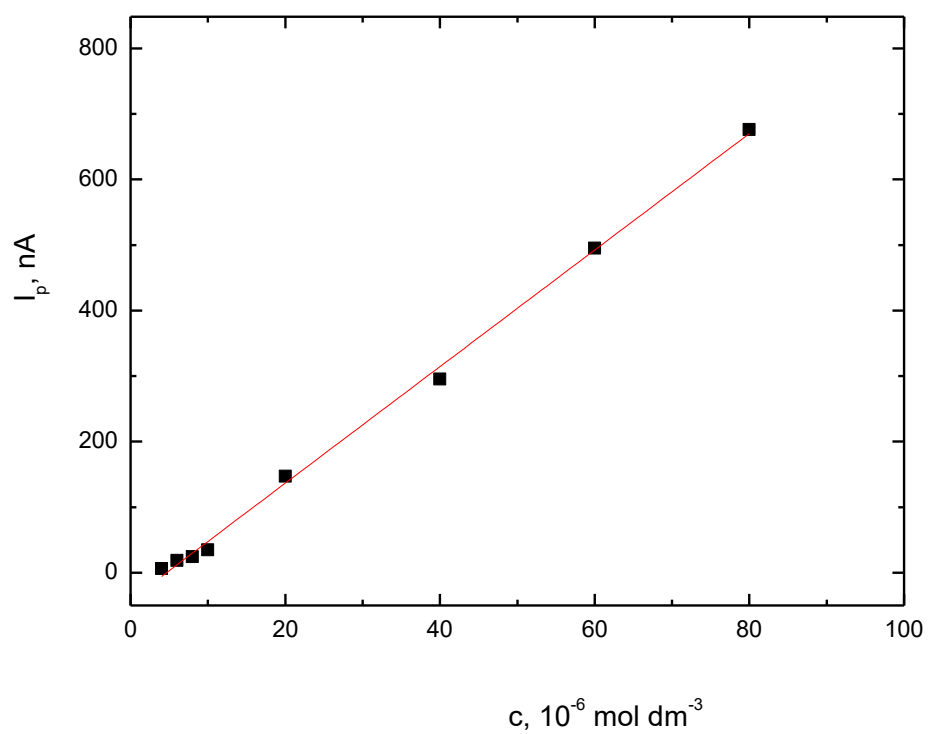
Mez detekce metody byla vypočítána jako $8,76 \times 10^{-6}$ mol dm^{-3} . Mez stanovitelnosti byla rovna $1,85 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3} . Byla prokázána linearita kalibrační závislosti, protože hodnota korelačního koeficientu byla větší než 0,99.

Tab. 3.2 Přehled parametrů kalibrační závislosti od 4×10^{-6} do 8×10^{-5} mol dm^{-3} 4-aminopyridinu, měřeno diferenční pulzní voltametří s uhlíkovou pastovou elektrodou v prostředí Brittonova-Robinsonova pufru o pH 9.

<i>Směrnice</i>	<i>Směrodatná odchylka směrnice</i>	<i>Úsek</i>	<i>Směrodatná odchylka úseku</i>	<i>r</i>	<i>Směrodatná odchylka</i>	<i>LOD</i>	<i>LOQ</i>
<i>nA (mol dm⁻³)⁻¹</i>	<i>nA (mol dm⁻³)⁻¹</i>	<i>nA</i>	<i>nA</i>		<i>nA</i>	<i>mol dm⁻³</i>	<i>mol dm⁻³</i>
8,891	0,162	-41,247	6,322	0,9990	12,233	$8,76 \times 10^{-6}$	$1,85 \times 10^{-5}$



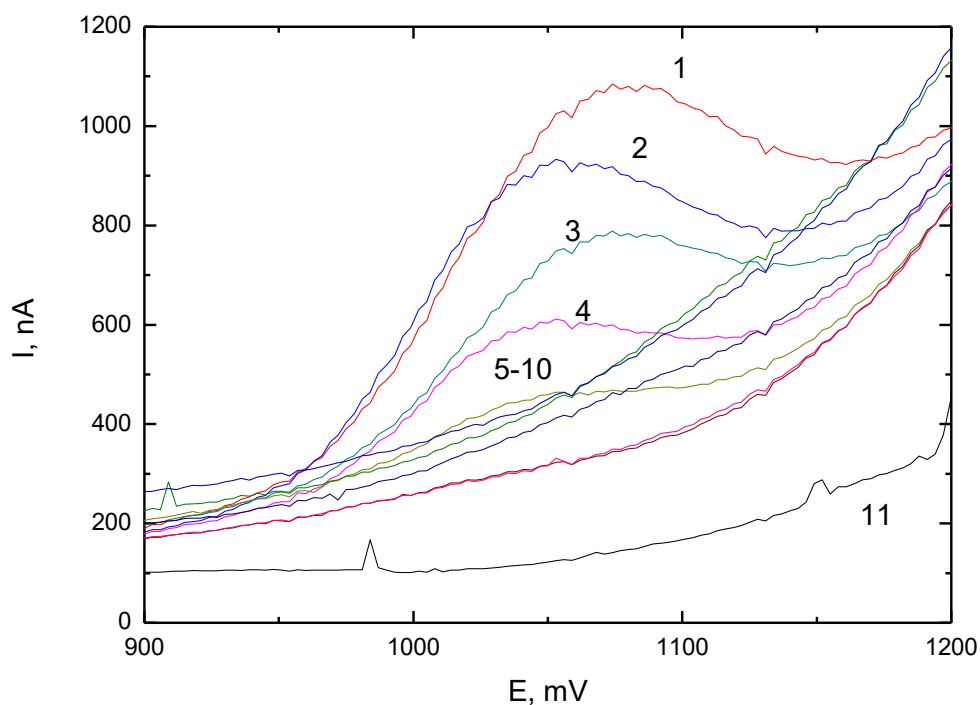
Obr. 3.8 Vybrané voltamogramy 4-aminopyridinu na uhlíkové pastové elektrodě v prostředí Brittonova-Robinsonova při pH 9. Koncentrace 4-aminopyridinu (1) 1×10^{-4} , (2) 8×10^{-5} , (3) 6×10^{-5} , (4) 4×10^{-5} , (5) 2×10^{-5} , (6) 1×10^{-5} , (7) 8×10^{-6} , (8) 6×10^{-6} , (9) 4×10^{-6} , (10) 2×10^{-6} mol dm^{-3} a (11) základní elektrolyt, parametry: rychlost polarizace 20 mV s^{-1} , výška pulzu 50 mV, šířka pulzu 80 ms.



Obr. 3.9 Kalibrační závislost v koncentračním rozmezí od 4×10^{-6} do $8 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ 4-aminopyridinu na uhlíkové pastové elektrodě prostředí Brittonova-Robinsonova při pH 9.

3.4 Kalibrační závislost s použitím modifikované uhlíkové pastové elektrody

Při použití modifikované uhlíkové pastové elektrody nedošlo ke zvýšení citlivosti metody. Naopak výsledné hodnoty píků byly podstatně nižší než při použití nemodifikované pasty pro stejnou kalibrační závislost.



Obr. 3.10 Vybrané voltamogramy 4-aminopyridinu na modifikované uhlíkové pastové elektrodě v prostředí Brittonova-Robinsonova při pH 9. Koncentrace 4-aminopyridinu (1) 1×10^{-4} , (2) 8×10^{-5} , (3) 6×10^{-5} , (4) 4×10^{-5} , (5) 2×10^{-5} , (6) 1×10^{-5} , (7) 8×10^{-6} , (8) 6×10^{-6} , (9) 4×10^{-6} , (10) 2×10^{-6} mol dm⁻³ a (11) základní elektrolyt, parametry: rychlost polarizace 20 mV s⁻¹, výška pulzu 50 mV, šířka pulzu 80 ms.

4 Závěr

Byla vyvinuta a optimalizována metoda pro voltametrické stanovení 4-aminopyridinu pomocí diferenční pulzní voltametrie za použití uhlíkové pastové elektrody. Za optimální prostředí byl použit Brittonův-Robinsonův pufr s hodnotou pH 9. Dále bylo potvrzeno, že dochází k pasivaci elektrody a je nutno vždy obnovovat povrch elektrody. Bylo prostudováno chování 4-aminopyridinu při použití akumulace bez zvýšení citlivosti metody.

Byla proměřena kalibrační závislost za optimálních podmínek od koncentrace 1×10^{-6} do 1×10^{-4} mol dm⁻³. Byla stanovena mez detekce $8,76 \times 10^{-6}$ mol dm⁻³ a stanovitelnosti $1,85 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³ 4-aminopyridinu. Linearita kalibrační závislosti byla hodnocena pomocí korelačního koeficientu, který byl vyšší než 0,99.

Při srovnání výšek píků 4-aminopyridinu v kalibrační závislosti s modifikovanou uhlíkovou pastovou elektrodou a uhlíkovou pastovou elektrodou lze konstatovat, že modifikace složení pasty nepřinesla žádné zvýšení citlivosti metody.

Literatura

- [1] Hussein L.; Leussink V.I.; Kieseier B.C.; Hartung H.-P.: 4-Aminopyridin (Fampridin). *Der Nervenarzt* **81**:2, 203–211 (2010).
- [2] Sigma-Aldrich: *Material Safety Data Sheet for 4-aminopyridine*. Dostupné z URL: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Aldrich/Product_Information_Sheet/a78403pis.pdf> [cit. 20.7.2016]
- [3] Sweetman S.C.: *Martindale The Complete Drug Reference*. 36th Ed. London, Pharmaceutical Press, 2009.
- [4] Anderson F. P.; Gallagher J. F.; Kenny P. T. M.; Lough A. J.: Redetermination of para-aminopyridine (fampridine, EL-970) at 150 K. *Acta Crystallographica Section E* **61**:5, 1350–1353 (2005).
- [5] Cameo Chemicals: *4-Aminopyridine, APY*. Dostupné z URL: <<https://cameochemicals.noaa.gov/chris/APY.pdf>> [cit. 21.7.2017]
- [6] Environmental Protection Agency: *Reregistration Eligibility Decision for 4-aminopyridine*. Dostupné z URL: <https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/aminopyridine_red.pdf> [cit. 21.7.2017]
- [7] Haynes W. M.: *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 94th Ed. CRC Press 2003.
- [8] Ashford R. D.: *Ashford's Dictionary of Industrial Chemicals: properties, production, uses*. London, Wavelength Publications 1994.
- [9] *Příbalový leták léčiva Fampyra 10 mg*. Dostupné u URL: <<https://pribalovy-letak.info/fampyra-10-mg>> [cit. 20.7.2016]
- [10] OSHA: *2-Aminopyridine, 3-Aminopyridine, 4-Aminopyridine; PV2143*. Dostupné u URL: <<https://www.osha.gov/dts/sltc/methods/partial/pv2143/pv2143.pdf>> [cit. 21.7.2017]
- [11] Damani L. A.; Petterson L. H.; Gorrod J. W.: Thin-layer chromatographic separation and identification of tertiary aromatic amines and their *N*-oxides. *Journal of Chromatography A* **155**:2, 337–348 (1978).

-
- [12] Broquier M.; Soorkia S.; Dedonder-Lardeux C.; Jouvet Ch.; Theulé P.; Grégoire G.: Twisted Intramolecular Charge Transfer in Protonated Amino Pyridine. *The Journal of Physical Chemistry A* **120**, 3797–3809 (2016).
- [13] Capacio B. R.; Byers C. E.; Matthews R. L.; Chang F.C. T.: A Method for Determining 4-Aminopyridine in Plasma: Pharmacokinetics in Anaesthetized Guinea Pigs after Intravenous Administration. *Biomedical Chromatography* **10**, 111–116 (1996).
- [14] Shinohara Y.; Miller R.D.; Castagnoli N.: Ion-pair high-performance liquid chromatographic assay of 4-aminopyridine in serum. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **230**:2, 363–372 (1982).
- [15] Opekar F.: *Základní analytická chemie pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. Praha, Karolinum 2002.
- [16] Záruba K.: *Analytická chemie*. Praha, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze 2016.
- [17] Wang J.: *Analytical electrochemistry*. 3rd Ed. Wiley 2006.
- [18] Adams R. N.: Carbon Paste Electrodes. *Analytical Chemistry*. **30**:9, 1576 (1958).
- [19] Vytřas K.; Švancara I.; Metelka R.: Carbon paste electrodes in electroanalytical chemistry. *Jornal of the Serbian Chemical Society* **74**:10, 1021–1033 (2009).
- [20] Sadegh A.; Hasan K.; Mohsen K.; Khadijeh A.: Voltammetric Determination of Captopril Using Multiwall Carbon Nanotubes Paste Electrode in the Presence of Isoproterenol as a Mediator. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* **15**:1, 107–117 (2014).
- [21] Nayan S. G.; Bankim J. S.; Ashwini K. S.: Potentiometric stripping analysis of antimony based on carbon paste electrode modified with hexathia crown ether and rice husk. *Analytica Chimica Acta* **703**:1, 31–40 (2011).
- [22] Švancara I.; Schachl K.: Testing of unmodified carbon paste electrodes. *Chemické Listy* **93**, 490 – 499 (1999).
- [23] Barek J.; Opekar F.; Štulík K.: *Elektroanalytická chemie*. Praha, Karolinum 2005.